

脑卒中生物学标志研究进展

曾丽莉 陈生弟

【关键词】 卒中； 生物学标记； 综述文献

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2011.02.010

近年来,我国脑卒中发病率一直居高不下,每年约有 $(1.50 \sim 2.00) \times 10^6$ 例新发病例^[1],年病死率约116.63/10万,仅次于恶性肿瘤位列疾病死因的第2位,给社会带来的经济负担每年高达374亿元人民币^[2]。因此早期诊断、病情监测和个体化治疗显得尤为重要。除了临床症状和神经系统体格检查外,脑卒中的诊断和监测在很大程度上依赖近期迅速发展的神经影像学诊断技术,如MRI扩散加权成像(DWI)、灌注成像(PWI)、磁敏感加权成像(SWI)等,但是这些设备存在以下缺点:基层医院不具备条件;对某些躁动、昏迷或有MRI检查禁忌证的患者不适用;检查耗时长,可能使患者错失最为宝贵的治疗时间窗。不同疾病的遗传方式、基础疾病、发病情况,以及对药物的敏感性有所不同,脑卒中治疗需要严密的病情监测手段和疗效评价指标,从而帮助制定个体化治疗方案。迄今为止,重组组织型纤溶酶原激活物(rt-PA)是唯一被美国食品与药品管理局(FDA)证实治疗急性脑卒中有效的药物;然而,由于狭窄的治疗时间窗(3.00~4.50 h)和严重的颅内出血并发症使大部分患者无法受益,而神经保护药物的作用靶点过于单一,干细胞和基因治疗的临床转化及安全监控问题均有待解决^[3-4]。寻求一种简便稳定易测、特异性和敏感性均较高且能反映缺血脑组织损伤及修复情况的生物学标志,对于脑卒中的诊断与治疗具有重要临床实用意义,也一直是脑血管疾病研究的热点问题。笔者拟就近年来有关缺血性卒中生物学标志的研究进展作一简要概述。

基金项目:上海交通大学“医工(理)交叉研究基金”项目(项目编号:YG2010MS21)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院神经内科,上海交通大学医学院神经病学研究所

通信作者:陈生弟(Email:chen_sd@medmail.com.cn)

一、生物学标志的分类

1. 根据采集来源不同,可以分为外周血生物学标志、尿液生物学标志、脑脊液生物学标志、神经影像学生物学标志等。

2. 根据临床意义不同,可以分为诊断性生物学标志,如早期鉴别缺血性和出血性卒中及缺血性卒中亚型(大动脉粥样硬化、心源性栓塞、小动脉闭塞等)的分类诊断;病情监测生物学标志,如监测重型脑卒中脑水肿情况以预防脑疝形成、预测进展性卒中、预测缺血区的出血转化;预后评价生物学标志,可评价疾病严重程度及远期预后;治疗评价生物学标志,对一些药物治疗效果和不良反应进行观察,并指导制定治疗方案^[5]。

3. 根据作用机制的不同,可以分为兴奋性毒性、炎症反应、氧化应激、内皮损伤、凝血与纤溶等相关生物学标志,与缺血性卒中后一系列瀑布式级联反应所致损伤的各种病理生理学通路密切相关。

4. 根据生物学标志的性质,可以分为蛋白质类生物学标志和核酸分子生物学标志。

二、生物学标志的作用机制

缺血性卒中主要是由于支配脑组织供血的血管发生狭窄或闭塞导致该区域供血不足,缺血区神经元缺氧缺糖发生无氧酵解、能量代谢障碍而死亡。脑缺血后,大量活性氧产生,造成氧化应激性损伤,兴奋性氨基酸释放,细胞因子、趋化因子、黏附分子、基质金属蛋白酶(MMPs)大量分泌,血-脑脊液屏障破坏,中性粒细胞向缺血中央区聚集,阻塞微循环产生“无复流”现象,神经毒性物质生成,缺血区神经元发生凋亡和死亡。与上述神经元损伤、血管损伤、炎症反应、血栓形成等各种通路相关的分子均可作为生物学标志的候选者^[4]。业已发现,有些中枢神经细胞如神经元、神经胶质细胞(星形胶质细胞、少突胶质细胞)等在脑组织损伤早期可

以释放一些具有组织特异性的标志物,透过被破坏的血-脑脊液屏障进入血液循环,在外周血血浆或血清中进行检测从而反映脑缺血损伤情况,如神经元特异性烯醇化酶(NSE)、S-100 β 蛋白、髓鞘碱性蛋白(MBP)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、 β 神经生长因子(bNGF)、N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体自身抗体(NMDA receptor auto antibodies)、PARK7、核苷酸二磷酸激酶A(NDKA)等^[6]。血管损伤可使其组成部分如血管内皮细胞、平滑肌细胞、结缔组织破坏,释放分泌某些蛋白质至血液中,例如细胞黏连蛋白、可溶性血管细胞黏附分子-1(sVCAM-1)、血管性血友病因子(vWF)等。炎症反应相关生物学标志包括C-反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6、MMP-9、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)。与血栓形成有关的生物学标志有D-二聚体、纤维蛋白原、可溶性糖蛋白V等^[7]。氧化应激相关性生物学标志有丙二醛、髓过氧化物等^[8]。

三、理想的生物学标志

理想的生物学标志应具备以下特点:首先,检测标本来源方便、快速、易取。血液采集简单、快速,血浆或血清无疑是诊断性生物学标志的最佳来源。其次,具有组织特异性,即仅在脑组织中特异性表达,机体其他器官不表达,能够特异性反映脑损伤与修复情况。再次,具有鲜明的诊断或治疗价值,能够实际解决临床诊断与治疗工作中的困难。例如,当患者症状轻或处于疾病早期,CT影像学尚无法显示病灶时,进行生物学标志检测即可明确诊断是否存在脑卒中,并能够鉴别缺血性和出血性卒中及脑卒中亚型,预测短期或长期预后,以便于综合分析制定治疗方案,是否进行溶栓并评价溶栓疗效和出血风险等。最后,生物学标志检测方法需具备简便、稳定、重复性良好等特点,以及较小的组间差异和组内差异。

四、诊断性生物学标志

缺血性卒中急性期溶栓治疗的最佳时机主要在发病后3h内,而能在此时间段内到达医院并完成溶栓前评价准备的患者甚少,据统计,我国每年仅有不足1%的患者能从溶栓治疗中获益^[1]。究其原因,与健康宣传教育力度不够、急救通道建立不完善,以及脑卒中诊断延误有关。患者在出现脑卒中先兆时缺乏及时就医的意识,而各医疗中心尚未有效建立脑卒中救治绿色通道;到达医院后脑卒中诊断依靠神经影像学检查耗时长等都是造成患者

无法及时获得有效治疗的原因。如果根据患者临床表现结合简便的临床检测,即可在救护车救护途中或到达医院后短时间内作出正确诊断并进行溶栓前评价,将大大降低脑卒中病残率和病死率。如同急性心肌梗死的心肌酶谱测定一样,缺血性脑损伤亦需要有生物学标志来进行快速诊断。

1. 缺血性卒中与出血性卒中 不同学者分别研究 β -球蛋白DNA(β -globin DNA)、S-100 β 蛋白、载脂蛋白C1(ApoC1)、载脂蛋白C3(ApoC3)、胶质纤维酸性蛋白、NMDA受体亚型NR2a/2b抗体等数种候选生物学标志,以鉴别缺血性和出血性卒中的敏感性和特异性。结果发现,发病6h内,脑出血患者血清胶质纤维酸性蛋白水平较脑梗死患者明显升高,以2.90 ng/L为临界值,其诊断出血性卒中的敏感度为79%,特异度高达98%^[9]。这用来解释急性脑出血后血-脑脊液屏障迅速破坏,神经胶质细胞坏死,快速释放胶质纤维酸性蛋白至血液中的原因;而胶质纤维酸性蛋白表达高峰在脑梗死患者有所延迟,一般出现在发病后2~3d,可能与缺血区细胞缓慢释放胶质纤维酸性蛋白至细胞外并透过血-脑脊液屏障进入血液有关^[9]。Allard等^[10]采用蛋白质组学的方法对缺血性和出血性卒中患者血清脂质变化进行观察,发现出血性卒中患者血清ApoC-III和ApoC-I表达水平明显降低,其中ApoC-III敏感度和特异度分别为94%和87%。

2. 缺血性卒中与非卒中 Whiteley等^[11]对数年来报道的多项缺血性卒中诊断性生物学标志研究结果进行总结分析,结果提示:在单一或一组血液生物学标志中诊断敏感度达90%以上者有NDKA、PARK7、泛素融合降解蛋白(UFD)、NMDA受体2(NR2)片段、NR2a/2b抗体;特异度达90%以上者有PARK7/RNA-BP、UFD、NDKA、胎盘型谷胱甘肽S转移酶(GST-P)、缺血修饰白蛋白(IMA)、视锥蛋白样蛋白-1(VLP-1)、 β -球蛋白DNA、NR2片段、S-100 β 蛋白、脂肪酸结合蛋白(FABP)、神经元特异性烯醇化酶、NR2a/2b抗体、髓鞘碱性蛋白、血栓调节蛋白(TM),而其中特异度高达95%以上的生物学标志为S-100 β 蛋白、髓鞘碱性蛋白、神经元特异性烯醇化酶、血栓调节蛋白、 β -球蛋白DNA等。NMDA受体主要介导缺血后兴奋性氨基酸毒性,其抗体在血液中可测得。有研究表明,发病3h内缺血性卒中患者血清抗体水平高于正常对照组,NMDA受体抗体诊断敏感度和特异度分别为97%和98%,但它在陈

旧性梗死灶或易感因素高危人群中的表达水平亦升高,一定程度上降低了其临床应用价值^[12]。缺血性脑损伤为一瀑布式级联反应,单一生物学标志有一定局限性,只能反映缺血损伤的某一环节。因此,有学者开展了以数种生物学标志为一组物质来预测缺血性卒中发生的研究。研究显示,如将 S-100 β 蛋白、 β 神经生长因子、MMP-9、血管性血友病因子、单核细胞趋化蛋白-1 等作为一组生物学标志进行联合检测,其在缺血后 12 h 内的诊断敏感度和特异度分别为 91% 和 97%;若联合 S-100 β 蛋白、脑尿钠肽(BNP)、C-反应蛋白、MMP-9、D-二聚体等生物学标志,发病 6 h 内的诊断敏感度和特异度分别为 81% 和 70%;将 S-100 β 蛋白、脑尿钠肽、MMP-9、D-二聚体联合检测,发病 24 h 内的诊断敏感度和特异度仅为 86% 和 37%^[11]。之前开展的各项研究在结果上缺乏一致性,很大程度上与所选择的对照不同有关,结局较好的试验结果多选择完全正常者作为对照^[5],而诊断准确率较低的试验则多以有类似脑卒中症状但非血管性疾病的患者作为对照,如偏头痛、癫痫、低血糖、中枢神经系统肿瘤等^[5],在这些疾病中亦有炎症反应、兴奋性毒性、神经元凋亡和死亡等机制参与,使得部分相关生物学标志的诊断特异性显著降低。因此,寻求具有高度特异性的脑缺血生物学标志仍是有待解决的问题。最新研究报道还发现了一些肾脏生物学标志如尿白蛋白/肌酐比值(UACR),其与老年人群缺血性卒中的发生高度相关($HR = 2.10, 95\%CI: 1.47 \sim 3.00$)^[13]。

3. 缺血性卒中亚型 缺血性卒中根据不同病因可以分为大动脉粥样硬化、心源性栓塞、小动脉闭塞、其他原因致病等各种亚型,而不同亚型选择的治疗方案亦有所不同^[14]。采用芯片技术分别检测不同亚型 mRNA 表达谱的差异,发现大动脉粥样硬化性卒中与心源性卒中间存在 23 种基因表达差异,诊断特异度达 95%,敏感度 95.20%^[15]。对心源性栓塞患者是否由心房颤动引起进行进一步分析发现,有 36 种基因可以作为鉴别二者的标志物,其特异度和敏感度均 > 90%^[16]。

五、治疗评价生物学标志

1. 血管再通 溶栓药物 rt-PA 治疗急性期缺血性卒中的时间窗为 4.50 h,对其疗效的监测需评价血管再通情况,目前多依赖神经影像学来实现。有研究显示,在溶栓过程中纤溶系统起重要作用,经静脉注射 rt-PA 获得血管再通的患者其纤溶指标纤

溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)水平明显降低,若 PAI-1 > 34 ng/ml 即提示溶栓治疗无效;此外,在各项凝血指标中 α 2-抗纤维蛋白溶酶(α 2-antiplasmin)预测血管再通的特异度为 85%,敏感度 25%^[5]。

2. 预测出血转化 采用溶栓、抗凝、降纤、抗血小板聚集等方法治疗缺血性卒中,均有发生出血风险的可能。而大面积脑梗死后缺血区亦有可能发生出血转化^[17],主要由于缺血后血-脑脊液屏障通透性增加,神经血管单位中细胞外基质、内皮细胞、神经元、神经胶质细胞、壁细胞等成分损伤,发生不可逆性脑实质坏死,期间蛋白水解、氧化应激反应和炎症反应参与其中而成为出血转化的生物学标志。出血转化与血-脑脊液屏障破坏密切相关,而 MMP-9 在血-脑脊液屏障的破坏中起着重要作用,它可降解血-脑脊液屏障成分如层黏连蛋白和纤维黏连蛋白,并增强红细胞外渗和中性粒细胞浸润;而 MMP-9 在外周血中表达水平与血-脑脊液屏障破坏密切相关,接受溶栓治疗的缺血性卒中患者 MMP-9 表达水平均高于未溶栓者,> 140 ng/ml 则高度提示存在出血风险,可预警出血发生并指导制定治疗方案^[18]。除此之外,血-脑脊液屏障不完整还表现在细胞黏连蛋白水平升高(> 3.60 μ g/ml),S-100 β 蛋白和胶质纤维酸性蛋白等神经元和神经胶质细胞蛋白的释放,活性氧 F2-异前列腺素(F2-isoprostanes)表达水平升高等^[7],但其对出血转化风险的预警性尚有待进一步研究。凝血指标也可在一定程度上反映出出血倾向。例如 PAI-1 < 21.40 ng/ml,由凝血酶激活的纤溶抑制物(TAFI) > 180%,其诊断敏感度为 75%,特异度 98%^[7]。

3. 预后 已知许多生物学标志与疾病预后即病死率和病残率密切相关,共涉及缺血性卒中病理生理学机制的不同环节 60 余种。例如:炎症反应、神经胶质细胞损害、凝血与止血、兴奋性神经递质、心脏损伤、抗炎作用、抗血栓作用等。但大多数研究均存在样本量小、相关度低、未进行年龄或疾病严重程度及其他因素校正等设计缺陷。经过严格筛选并进行校正($OR > 3$)的研究结果表明,炎症反应指标(C-反应蛋白 > 15 mg/L、IL-6 > 21.50 pg/ml、细胞间黏附分子),凝血指标(D-二聚体、纤维蛋白原 > 3.50 g/L),心脏损伤指标(脑利钠肽 > 500 pmol/L、心钠素 > 850 pmol/L、肌钙蛋白 T > 0.03 μ g/ml),抗炎作用指标(IL-10 < 6 pg/ml、皮质醇 > 0.84 nmol/L),抗血栓作用指标(血栓素)等多项实验室指标与患者

预后密切相关^[19-20]。但生物学标志应用于临床尚需经大量重复性试验结果的证实。

六、临床试验设计存在的问题

目前,大量临床试验集中于缺血性卒中生物学标志的研究探索,但是由于脑缺血损伤和修复机制的复杂性、血-脑脊液屏障的存在,以及试验设计存在的缺陷,至今尚无广泛用于临床实践的生物学标志,仍有许多问题有待解决。首先,如何选择候选生物学标志?需明确拟解决的临床问题,脑卒中的病理生理学机制有多条通路,选择一组生物学标志较单一标志更为全面。其次,不能忽略血-脑脊液屏障的存在及其是否完整,它直接影响生物学标志在血液中的测定和时间分布。再次,研究设计必须严谨,现在有许多研究存在样本量、对照组选择、变量校正等试验设计方面的缺陷。一项高质量的生物学标志临床研究需要采用统计学方法先确定样本量的大小,采用随机双盲原则选择患者进行前瞻性研究,入选标准需统一并切勿忽略药物治疗的影响,检测方法需稳定、组内和组间差异小,实验结果需经 Logistic 回归模型校正后分析,检测阈值还需在其他独立群体中进行检测和验证。总之,缺血性卒中生物学标志的研究临床意义重大,需要多中心大样本规范研究工作。

参 考 文 献

[1] Liu M, Wu B, Wang WZ, et al. Stroke in China: epidemiology, prevention, and management strategies. *Lancet Neurol*, 2007, 6: 456-464.

[2] Wang YL, Wu D, Liao X, et al. Burden of stroke in China. *Int J Stroke*, 2007, 2:211-213.

[3] 沈帆霞, 陈生弟. 血管内皮细胞生长因子的血管新生、神经新生及神经保护作用. *中国现代神经疾病杂志*, 2006, 6:143-146.

[4] 王永亭, 曾丽莉, 吕海燕, 等. 缺血性卒中病因学与发病机制研究的十年进展. *中国现代神经疾病杂志*, 2010, 10:2-27.

[5] Castellanos M, Serena J. Applicability of biomarkers in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*, 2007, 24 Suppl 1:7-15.

[6] Foerch C, Montaner J, Furie KL, et al. Invited article: searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology*, 2009, 73:393-399.

[7] Rosell A, Foerch C, Murata Y, et al. Mechanisms and markers for hemorrhagic transformation after stroke. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 105:173-178.

[8] Domínguez C, Delgado P, Vilches A, et al. Oxidative stress after thrombolysis-induced reperfusion in human stroke. *Stroke*, 2010, 41:653-660.

[9] Foerch C, Curdt I, Yan B, et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006, 77:181-184.

[10] Allard L, Lescuyer P, Burgess J, et al. ApoC- I and ApoC- III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke. *Proteomics*, 2004, 4:2242-2251.

[11] Whiteley W, Tseng MC, Sandercock P. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*, 2008, 39:2902-2909.

[12] Dambinova SA, Khounteev GA, Izykenova GA, et al. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. *Clin Chem*, 2003, 49:1752-1762.

[13] Aguilar MI, O'Meara ES, Seliger S, et al. Albuminuria and the risk of incident stroke and stroke types in older adults. *Neurology*, 2010, 75:1343-1350.

[14] 刘鸣, 张月辉, 吴丽娥. 缺血性脑卒中的分型及与预后的关系. *中国现代神经疾病杂志*, 2004, 4:69-71.

[15] Xu H, Tang Y, Liu DZ, et al. Gene expression in peripheral blood differs after cardioembolic compared with large - vessel atherosclerotic stroke: biomarkers for the etiology of ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28:1320-1328.

[16] Jickling GC, Xu H, Stamova B, et al. Signatures of cardioembolic and large - vessel ischemic stroke. *Ann Neurol*, 2010, 68:681-692.

[17] 张立娟, 金磊. 较大面积缺血性卒中出血性转化预后分析. *中国现代神经疾病杂志*, 2010, 10:213-218.

[18] Ramos - Fernandez M, Bellolio MF, Stead LG. Matrix metalloproteinase -9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2011, 20:47-54.

[19] Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, et al. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*, 2009, 40:E380-389.

[20] Di Napoli M, Singh P. Is plasma fibrinogen useful in evaluating ischemic stroke patients? Why, how, and when. *Stroke*, 2009, 40:1549-1552.

(收稿日期:2011-02-18)

· 小 词 典 ·

中英文对照名词词汇(八)

抗神经节苷脂抗体 anti-ganglioside antibody(AGA)

抗双链 DNA 抗体 anti-double stranded DNA antibody(dsDNA)

抗中性粒细胞胞质抗体 anti-neutrophil cytoplasmic antibody(ANCA)

可溶性血管细胞黏分子-1

soluble vascular cell adhesion molecule-1(sVCAM-1)

可提取性核抗原 extractable nuclear antigen(ENA)

跨大西洋无症状性颈动脉介入试验 Transatlantic Asymptomatic Carotid Intervention Trial (TACIT)

扩展残疾状况评分 Expanded Disability Status Scale(EDSS)